

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



Комитет Российской Федерации  
по патентам и товарным знакам

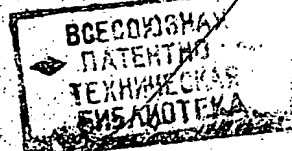
(19) RU (11) 2004247 C1

(51) 5 A 61 K 35/39

№ 7 04 54

# ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К ПАТЕНТУ



1

(21) 5025634/14

(22) 020392

(46) 15.12.93 Бюл. № 45-46

(76) Лифшиц Юрий Зиновьевич; Кожара Светлана Павловна; Ландау Светлана Михайловна

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ИМПЛАНТАТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ

(57) Изобретение относится к хирургии и терапии и может быть использовано при лечении сахарного диабета. Способ лечения основан на внутримышечной имплантации определенного количества перививаемой культуры клеток доброкачественной

2

инсулиномы человека. Способ получения имплантата для лечения сахарного диабета включает культивирование клеток инсулиномы и формирование банка культуры. При культивировании клеток измеряют их количество и содержание инсулина в культуральной среде через заданные промежутки времени и по полученным данным определяют производительность инсулина данной культурой клеток по которой определяют объем имплантата. Изобретение позволяет повысить эффективность лечения путем увеличения ремиссий и точности определения объема имплантата. 2 с. и 1 зл.ф-лы.

(19) RU

(11) 2004247 C1

Изобретение относится к хирургии и терапии и может быть использовано при лечении сахарного диабета.

Известны способы лечения инсулинозависимого сахарного диабета, включающие имплантацию фетальных  $\beta$ -клеток внутрипеченочно или внутримышечную имплантацию  $\beta$ -клеток новорожденных поросят. Однако все эти способы малоэффективны из-за короткого срока ремиссии.

Известны также способы получения имплантата для лечения сахарного диабета путем культивирования инсулин продуцирующих клеток и формирования банка культуры. К недостаткам этих способов следует отнести низкую точность определения объема трансплантата, т.е. количество клеток, которое необходимо имплантировать конкретному пациенту.

Наиболее близким по технической сущности и принятым за прототип является способ лечения сахарного диабета, включающий внутримышечную имплантацию клеток поджелудочной железы. Однако и этот способ имеет низкую эффективность лечения.

Из способов получения трансплантата в качестве прототипа выбран способ, основанный на однослойном культивировании клеток инсулиномы человека сроком до 1 недели.

Недостатком известного способа является низкая точность определения объема трансплантата.

Задачей изобретения является повышение эффективности лечения сахарного диабета путем увеличения ремиссии трансплантации и увеличения точности выбора объема трансплантата.

Поставленная задача решается тем, что в способе лечения сахарного диабета, включающем имплантацию клеток поджелудочной железы, имплантируют перевиваемую культуру клеток доброкачественной панкреатической инсулиномы человека.

Культуру клеток имплантируют внутрипеченочно или внутримышечно, преимущественно в прямую мышцу живота в виде взвеси, например, на физрастворе. При этом количество имплантируемых клеток для конкретного пациента определяют по соотношению

$$N = \frac{Q}{q},$$

где  $N$  — количество имплантируемых клеток, тыс.;

$Q$  — суточная потребность пациента в инсулине, ед.;

$q$  — суточная производительность инсулина 1 тыс. клеток, ед.

В способе получения имплантата для лечения сахарного диабета, включающем однослойное культивирование клеток инсулиномы человека и формирование банка культуры, при культивировании клеток измеряют их количество и содержание инсулина в культуральной среде через заданные промежутки времени и по полученным данным определяют производительность инсулина данной фракции культуры, по которой вычисляют количество клеток культуры, необходимое для приготовления имплантата конкретному пациенту.

Интервалы времени, через которые измеряют содержание инсулина в культуральной среде могут быть любые, однако предпочтительно задавать их в пределах от одних до нескольких суток. Это обеспечивает более высокую точность вычисления суточной производительности инсулина клетками, по которой определяется объем имплантата. При этом необходимо из учитывать непрерывный рост количества клеток в культуральной среде и для расчетов использовать их среднеарифметическое значение на соответствующем временном интервале.

Способ получения имплантата осуществляют следующим образом. У длительно наблюдаемого больного с доброкачественной панкреатической инсуломой выполняют энуклеацию опухоли. Инсулиному измельчают. По стандартной методике выделяют культуру клеток инсулиномы и культивируют на "матросах" в среде MEM или DMEM.

В процессе культивирования определяют суточную производительность инсулина заданным количеством клеток (1 тыс., 10 тыс., и т.д.) данной культуры. Для этого измеряют начальное количество клеток  $n_1$  и содержание инсулина  $I_1$  в культуральной среде. Через интервал времени  $t_1$  (от одних до нескольких суток) вновь измеряют количество клеток  $n_2$  и содержание инсулина  $I_2$  и по полученным данным вычисляют суточную производительность инсулина клетками  $q$  по соотношению

$$q = \frac{I_2 - I_1}{n_{cp} \cdot t_1}, \text{ ед./тыс. сут.}$$

где  $n_{cp} = \frac{n_1 + n_2}{2}$  — среднее арифметическое количество клеток культуры на интервале  $t_1$ . Величину  $q$  измеряют несколько раз и среднее значение заносят в паспорт или сертификат культуры при формировании банка.

После нарастания до монослоя на всем "матросе" клетки перевивают на новый "матрас", а заросший "матрас" направляют для формирования банка культуры путем программного замораживания клеток и хранения в жидком азоте.

Способ лечения сахарного диабета осуществляют следующим образом. Путем тщательного обследования больному проводят коррекцию гликемии на аппарате "искусственная поджелудочная эндокринная железа", например на "Биостаторе" фирмы "Miles" (США), (ФРГ) и уточняют суточную потребность в инсулине данного пациента и определяют необходимое для имплантации количество клеток инсуломы по соотношению

$$N = \frac{Q}{q}, \text{ тыс.},$$

где N – количество имплантируемых клеток, тыс.;

Q – суточная потребность пациента в инсулине ед.;

q – суточная производительность инсулина 1 тыс. клеток имеющейся в банке культуры, ед.

Забирают из банка культуры необходимое количество клеток N, готовят из них имплантат в виде взвеси на 15-30 мл физраствора и с помощью одноразового шприца вводят имплантат пациенту внутримышечно, например в прямую мышцу живота.

После имплантации больного наблюдают амбулаторно, периодически определяя его суточную потребность в инсулине, которая начинает снижаться на 7-е – 10-е сут после имплантации. Через 2-3 мес больные обычно отказываются от приема инсулина, либо его потребность стабилизируется на низком уровне 8-20 ед. в сутки.

Пример 1 конкретного получения имплантата. У больной Н., и/б № 10713, наблюдаемой в течение 7 лет с установленным диагнозом – доброкачественная панкреатическая инсулинома 19.03.91 г. произведена энуклеация опухоли.

Взят фрагмент опухоли массой 5,0 г, из которого получен банк культуры клеток инсуломы по следующей методике. Фрагмент опухоли измельчили до фрагментов размером 1-2 мм. Трехкратно промыли средой Игла. Добавили среду Игла 5 мл. Добавили коллагеназу до концентрации 2 мг/мл. Инкубировали в термостате при 37°C в течение 15 мин. Произвели дезагрегацию ткани на магнитной мешалке при 32-37°C в течение 15 мин. Центрифугировали при 1000 об/мин 10 мин. Получили фракцию № 1. Ее не ис-

пользовали. Добавили свежей среды с коллагеназой, дезагрегация на магнитной мешалке при 32-37°C 15 мин. Центрифугировали в течение 10 мин при 1000 об/мин. Получили

5 осадок клеток – это фракция № 2. Фракцию № 2 клеток дважды отмыли средой Игла и оставили в холодильнике до употребления. Добавили свежую среду Игла с коллагеназой и приготовили соответственно фракции

10 клеток № 3 и № 4. Каждую фракцию соответственно дважды отмыли средой Игла. Все фракции № 2, № 3, № 4 объединили и высевали на один маленький "матрас" на среду ДМЕМ (Дульбенко MEM) с 10% сыворотки эмбриона, предварительно проверенной на токсичность на перевиваемых СУ1 клетках почки обезьяны. В культурах клеток наблюдали три типа клеток: эпителиальные, фибробластоподобные и фибробласты. Клетки

20 выросли до монослоя за 14 дн и были перевиты на другой "матрас". Оставшийся после пересева "матрас" вырос до полного монослоя за 4 нед и его вновь перевиты на следующий "матрас". На третьей неделе роста

25 культуры было измерено содержание инсулина I<sub>1</sub> и количество клеток n<sub>1</sub> на первом "матрасе". Получены величины I<sub>1</sub> = 2172 ед, n<sub>1</sub> = 700 тыс. Через семь суток измерения повторены. Получены величины I<sub>2</sub> = 3838 ед,

30 n<sub>2</sub> = 10<sup>6</sup> кл. Из соотношения  $q = \frac{I_2 - I_1}{n_{ср} \cdot t_1}$  полу-

учили q<sub>1</sub> = 0,28 ед./тыс. в сутки. Аналогичные измерения и вычисления для матрасов № 2, №3 и № 4 дали q<sub>2</sub> = 0,33; q<sub>3</sub> = 0,26 и

35 q<sub>4</sub> = 0,35. Культивировали клетки инсуломы человека в течение 3 мес и провели 3 перевивки клеток. Из полученных 4-х полностью заросших до полного монослоя матрасов сформировали банк путем программного замораживания клеток и хранения в жидком

40 азоте. В сертификат банка занесено среднее значение q<sub>ср</sub> = 0,3. Следует отметить, что погрешность измерения количества клеток по нашим оценкам может лежать в пределах ±10 тыс., так как измерения проводились по площадям матрасов и зависят от плотности монослоя.

Пример 2. Больной З., 1950 г.р. и/б № 7248, болен сахарным диабетом 8 лет, суточная доза инсулина была 70 ед. 1 раз в сутки. Поступил в клинику КНИИКиЭХ 20.05.91 г. с жалобами на похудание, головные боли, частые гипогликемические состояния. Гликемия натощак 13-14 ммоль/л. Больному проведена коррекция гликемии на аппарате "Биостатор" фирмы "Miles" США, рекомендовано дробное введение инсулина.

На фоне субкомпенсации сахарного диабета больному 24.05.91 г. выполнена аллот-

рансплантация клеток инсулиномы человека.

По соотношению  $N = \frac{Q}{q}$  было подсчитано необходимое для имплантации количество клеток  $N = \frac{70}{0,3} \approx 233$  тыс. Из банка культуры клеток взято и разморожено примерно 230-250 тыс. клеток. Приготовлена взвесь из этих клеток на 20 мл физраствора и с помощью одноразового шприца введена в прямую мышцу живота пациента.

В течение первой недели после имплантации потребность в инсулине у больного оставалась прежней. Через 4 нед. – потребность в инсулине 8 ед. в сутки, а через 14 нед. больной отказался от инъекций инсулина. Наблюдается амбулаторно в течение 8 мес. состояние субкомпенсации, жалоб нет.

Пример 3. Больной Г., 1938 г. р. и/б № 7231 болеет сахарным диабетом 12 лет. Принимал инсулин 50-60 ед. в 2-х инъекциях в сутки. Поступил в клинику КНИИКиЭХ 10.04.91 г. в состоянии декомпенсации. Гликемия натощак 16-18 ммоль/л. Больному проведена коррекция гликемии на аппарате "Биостатор". Выписан в состоянии субкомпенсации на дозе инсулина 46-50 ед. (3 раза). Через 2 мес в состоянии компенсации (глюкоза натощак 6,0 ммоль/л, количество вводимого инсулина 50 ед. 1 раз в сутки) выполнена аллотрансплантация клеток инсуломы человека.

По соотношению  $N = \frac{Q}{q}$  подсчитано необходимое для имплантации количество клеток  $N = \frac{50}{0,3} \approx 166$  тыс.

Из банка культуры взято и размножено примерно 160-180 тыс. клеток, из которых приготовлена взвесь на 20 мл физраствора и с помощью одноразового шприца введена в прямую мышцу живота пациента.

Потребность в инсулине у больного в течение первой недели после имплантации оставалась прежней. Спустя 7-10 дн у больного появилось чувство гипогликемии (глюкоза снижалась до 2,7 ммоль/л), поэтому начали снижать количество вводимого инсулина до 18 ед. 2 раза в сутки. Через 14 нед.

после трансплантации наступила нормализация гликемии при дозе инсулина (просто) 18 ед. в сутки. Больной наблюдается более 7 мес. состояние удовлетворительное. Доза инсулина от 14 до 20 ед. в сутки 2 раза, находясь на обычном режиме питания (без ограничения углеводов).

По предложенному способу выполнена аллотрансплантация культуры п-п инсулиномы 4-м больным. Из них 2 человека полностью отказались от введения инсулина (один из них принимает сахароснижающие препараты). Один больной снизил вводимую дозу инсулина на 30 ед., один больной снизил дозу инсулина на 20 ед. (тяжелая форма, осложненная микро- и макроангиопатией и нефропатией).

Сроки наблюдения 5 – 8 мес.

Таким образом применение предложенных способов позволит повысить эффективность лечения больных с сахарным диабетом.

(56) Шалимов А.А. и др. Опыт коснотрансплантации культур клеток панкреатических островков после хирургического лечения хронического панкреатита. Клиническая хирургия, 1990, № 11, с. 1-3.

Комиссаренко В.П., Комиссаренко И.В. Трансплантация различных видов культур эндокринной части поджелудочной железы плодов человека и новорожденных поросят больным сахарным диабетом (Тез. докл. на 10-й Всесоюзной конф. по трансплантации органов – Киев, 1985, с. 55, 56).

Istet. Pancreas. – Transplantation artif. Pancreas workshop Voulgameni Beach, Athens, 1980. Stuttgart, New-Jork, 1982, p. 81-82.

Morris P.I., Crey D'W., Suston R., Pancreatik Istet Transplantation, British, 1989, vol. 46, № 1, p. 224-241.

Щумаков В.И., Блюмкин В.Н. и др. Клиническая аллотрансплантация культур островковых клеток поджелудочной железы плодов человека. Проблемы эндокринологии, 1985, т. 32, № 1, с. 18-22.

Structure Function and Immunology of Human Insuloma Cells. Diabetes, v. 37, September, 1988, p. 1270-1286.

### Формула изобретения

1. Способ лечения сахарного диабета, включающий имплантацию клеток поджелудочной железы, отличающийся тем, что имплантируют перевариваемую культуру клеток доброкачественной инсуломы человека.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что культуру клеток имплантируют в прямую мышцу живота в виде взвеси на физрастворе, при этом количество имплантируемых клеток определяют по соотношению

$$N = Q/q.$$

где  $N$  - количество имплантируемых клеток, тыс.;

$Q$  - суточная потребность пациента в инсулине, ед.;

$q$  - суточная производительность инсулина 1 тыс. клеток, ед.

3. Способ получения имплантата для лечения сахарного диабета, включающий однослойное культивирование клеток инсу-

диномы человека и формирование банка культуры, отличающийся тем, что при культивировании клеток измеряют их количество и содержание инсулина в культуральной среде через заданные промежутки времени и по уровню этих величин определяют производительность инсулина данной культурной клетки, по данной величине определяют количество клеток культуры, необходимое для приготовления имплантата.

Редактор Г. Мельникова

Составитель Н. Хрусталева  
Техред М. Моргентал

Корректор М. Петрова

Заказ 3362

Тираж  
НПО "Поиск" Роспатента  
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., 4/5

Подписное

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул. Гагарина, 101